ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ DE CERTAINS CHAMPIGNONS ANTAGONISTES VIS-A-VIS DE *VERTICILLIUM DAHLIAE* KLEBAHN.

par Jamel Eddine HENNI*

RÉSUMÉ — La germination des microsclérotes de *Verticillium dahliae* Kleb. est inhibée par les substances émises par *Trichoderma harzianum* et *Penicillium griseo-fulvum.*

SUMMARY — The germination of microsclerotes of *Verticillium dahliae* Kleb. is inhibited by substances secreted by *Trichoderma harzianum* and by *Penicillium griseo-fulvum.*

MOTS CLÉS : *Verticillium dahliae* Kleb., microsclérotes, filtrats, *Trichoderma harzianum, Penicillium griseo-fulvum*, antagonisme, Aubergine.

L'activité biologique des antogonistes vis-à-vis du *Verticillium dahliae* Kleb. peut s'exprimer par une action destructrice ou inhibitrice de la germination des microsclérotes. La présente étude a pour but de tester les substances émises par 4 champignons antagonistes sur le *V. dahliae* inoculé à des plants d'aubergines.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Plante-hôte

Le matériel végétal choisi est l'Aubergine, un des hôtes préférentiels du *V. dahliae*, variété «Violette longue de Barbentane» connue pour sa grande sensibilité vis-à-vis de ce parasite (VIGOUROUX & MOLOT, 1975). Cette plante présente des symptômes très caractéristiques de la maladie lorsqu'elle est attaquée par *V. dahliae* (ARNOUX & MESSIAEN, 1960).

Les semis des plantes est réalisé par le dépôt, dans chaque pot, de 2 à 3 graines à 1 cm de profondeur; après la germination des graines, une seule plante est conservée par pot.

* Institut de Biologie, Université d'Oran, Algérie.

Source : MNHN, Paris

Ces plantes sont cultivées en serre à une température moyenne de 26°C le jour et 19°C la nuit; l'humidité relative moyenne de l'atmosphère est de 60 %; l'humidité du sol est maintenue par un arrosage des plantes tous les 3 jours avec de l'eau de ville.

Recherche de la quantité optimale d'inoculum

Cette expérimentation est conduite avec des concentrations d'environ 5.10^2, 10^3 et 5.10^3 microsclérotes par pot.

— **Inoculation** : les inoculations sont réalisées par le dépôt de 1 ml d'une suspension de microsclérotes au niveau du collet des plantes, préalablement déchaussées. Bien que le parasite ait l'aptitude à pénétrer naturellement dans l'hôte ce déchaussement provoque des blessures racinaires qui augmentent le nombre de portes de pénétration (VIGOUROUX & CASTELAIN, 1966).

Les inoculations sont effectuées lorsque les plantes présentent 4 à 5 feuilles (plantes âgées de 4 semaines environ). Chaque essai est réalisé sur 30 plantes.

— **Réisolement du parasite** : l'estimation du taux d'attaque est faite 4 semaines après l'inoculation des plantes en déterminant celles qui hébergent le parasite. Le champignon est recherché au niveau de l'hypocotyle; pour cela, cet organe est prélevé et déposé à la surface d'un milieu amidon gélosé additionné d'antibiotiques (1g/l d'hydromycine + 1g/l de spécilline), après avoir été préalablement désinfecté par immersion pendant 30 secondes dans l'alcool à 90° et passage sur une flamme.

La lecture des résultats est effectuée au bout d'une semaine d'incubation à 26°C. Nous notons comme atteintes par le parasite les plantes qui ont donné naissance à un thalle de *V. dahliae*.

Tableau I

Quantité de microsclérotes par plante	Nombre de plantes attaquées (30)
5.10^2	23
1.10^3	26
5.10^3	28

D'après les résultats présentés dans le tableau I, il apparaît que le nombre de plantes atteintes est fonction de la concentration de l'inoculum. Pour nos essais, nous retiendrons donc la dose maximale de 5.10^3 microsclérotes par ml.

Champignons antagonistes utilisés

Il ont été choisis en fonction des travaux effectués par certains auteurs et appartiennent aux espèces suivantes : *Trichoderma hamatum* et *Trichoderma harzianum*, selon DENNIS & WEBSTER (1971); *Penicillium griseo-fulvum*, d'après NEWTON (1965) et *Gliocladium virens*, d'après WEBSTER & LOMAS (1964).

Source : MNHN, Paris

Tests *in vitro*

Nous nous sommes limités à l'étude d'un seul type d'action des antagonistes : l'émission de substances inhibitrices de la germination des microsclérotes dans le milieu de culture. Pour ce faire, nous avons mis en œuvre deux approches.

— **Méthode des filtrats de culture** : une bouture mycélienne prélevée dans la zone de croissance d'une culture de l'antagoniste est déposée dans une fiole de Roux contenant 150 ml de milieu liquide à 2 % d'extrait de malt. Ces fioles sont mises à incuber pendant 3 semaines à l'obscurité, à 26°C (CATANI & PETERSON, 1966; WILSON & PORTER, 1957). Après ce délai, le mycélium est séparé du milieu de culture par centrifugation à 4000 tours/mn pendant 30 mn, puis le surnageant est filtré sur filtre millipore 0,22 μ. Ces filtrats sont ensuite incorporés à un milieu amidon gélosé, maintenu à 40-45°C après autoclavage, avant d'être réparti dans les boîtes de Pétri. Ces mélanges se font dans des proportions 1 :1.

— **Méthode de double couche** : cette méthode, inspirée de FREDERICK & LEVINE (1947), permet de savoir si l'action des substances inhibitrices est fongicide ou fongistatique sur les microsclérotes. Pour ce faire, le champignon antagoniste est mis en culture sur milieu gélosé à 2 % d'extrait de malt, à 26°C. Après 7 jours de développement, la culture est tuée par l'adjonction de 1 ml de chloroforme pur. Au bout d'une semaine, quand le chloroforme s'est complètement évaporé, on place sur ces cultures des feuilles de cellophane sur lesquelles des microsclérotes de *V. dahliae* ont été déposées. Dans le cas où une inhibition de la germination est constatée, on transfère la cellophane sur milieu amidon gélosé. La lecture des résultats est faite après 48 h d'incubation à 26°C.

Adjonction de la substance antagoniste

Ce travail n'est entrepris qu'avec les champignons ayant bloqué la germination des microsclérotes *in vitro*. Nous avons retenu deux protocoles, inspirés des travaux de WILSON & PORTER (1957), ISAAC (1954) et DAVET & al. (1981).

Le premier consiste à traiter les plantes-hôtes avec 25 ml du filtrat de culture obtenu comme nous l'avons exposé plus haut. Le traitement réside en un arrosage des pots avec le filtrat simultanément à la contamination et une semaine avant l'inoculation des plantes par les microsclérotes.

Le deuxième consiste à contaminer les plantes-hôtes par une suspension de conidies de l'antagoniste. La contamination s'effectue par le dépôt de 1 ml de suspension titrant 4.10^6 conidies, à 1 cm de profondeur au pied de chaque plante, une semaine avant l'inoculation de la plante par les microsclérotes. Cette période permettra aux conidies de l'agent antagoniste de se développer et de secréter les substances inhibitrices. Chaque essai comporte (4) lots, de 30 plantes chacun :

- témoin non inoculé non traité,
- témoin inoculé non traité,
- témoin non inoculé traité,
- plantes inoculées et traitées.

Source : MNHN, Paris

RÉSULTATS

Tests *in vitro*

Les résultats permettent de constater que :

– la germination des microsclérotes de *V. dahliae* n'est pas affectée par les filtrats de culture de *Gliocladium virens* et *Trichoderma hamatum*. En effet, le taux de germination des microsclérotes sur ces milieux est respectivement de 91,8 et 94,1 %.

– La germination des microsclérotes est nulle sur un milieu de culture contenant des substances émises par *T. harzianum* et *P. griseo-fulvum*.

D'autre part, les expériences de transfert indiquent que *P. griseo-fulvum* [illegible] une action léthale sur les microsclérotes puisqu'aucun n'a germé après leurs reports sur le milieu amidon gélosé. En revanche, l'action de *T. harzianum* est réversible : 80,4 % des microsclérotes germent après leurs transferts sur le milieu amidon gélosé.

Tests sur les plantes-hôtes

Ces tests ont été réalisés avec *T. harzianum* et *P. griseo-fulvum*, et les résultats obtenus sont les suivants :

– **Effets des filtrats sur les plantes** : l'aspect extérieur des plantes témoins traitées avec les filtrats ou contaminées par les conidies des antagonistes ne révèle aucune altération particulière par rapport aux plantes témoins non traitées.

– **Effets préventifs des filtrats de culture de *P. griseo-fulvum* et de *T. harzianum* :**

a) Adjonction des filtrats une semaine avant l'inoculation des plantes par des microsclérotes : l'examen des résultats permet de constater que l'activité préventive des deux filtrats se manifeste pleinement vis-à-vis des microsclérotes, et que la stabilité de leurs produits actifs dans le sol présente une bonne persistance puisque le nombre de plantes infectées est nul après action des filtrats issus d'une culture de *P. griseo-fulvum* et n'atteint que 4 plantes chez ceux traités par les filtrats de *T. harzianum*.

b) Adjonction des filtrats simultanément à la contamination des plantes par les microsclérotes : les filtrats issus des cultures de *P. griseo-fulvum* et de *T. harzianum* font apparaître une action efficace vis-à-vis des microsclérotes. Le nombre de plantes attaquées est respectivement de 3 et 0.

– **Effets préventifs des conidies de *T. harzianum* et de *P. griseo-fulvum* :**

L'apport de *T. harzianum* ne se traduit par aucune action préventive contre l'infection des plantes par des microsclérotes, puisque le nombre de plantes infectées par les microsclérotes atteint 23.

Il en est de même pour *P. griseo-fulvum* puisque le nombre de plantes attaquées (15) ne diffère pas significativement du témoin (28).

Source : MNHN, Paris

Toutefois l'activité des micro-organismes antagonistes dépend des conditions environnementales (TRONSMO & DENNIS, 1978; TU, 1979) et il est possible que, dans les conditions utilisées, nous n'ayons pas pu les révéler.

CONCLUSION

La germination des microsclérotes du *V. dahliae* peut être inhibée pas des substances émises par *P. griseo-fulvum* ou de *T. harzianum*. En effet, ces substances permettent une protection des plantes contre leur infection par les microsclérotes du parasites.

Cette étude permet d'envisager une action complémentaire à la lutte chimique étant donné la stabilité de l'antagoniste à long terme par équilibre biologique.

BIBLIOGRAPHIE

ARNOUX M. et MESSLAEN C.M., 1960 — Essais de désinfection du sol contre la Verticilliose de l'Aubergine. *Phytiatrie - Phytopharm.* 9 : 115-121.

CATANI S.C. and PETERSON J.L., 1966 — Antogonistic relationships between *Verticillium dahliae* and fungi isolated from the rhizosphere of *Acer platanoides. Phytopathology* 57 : 363-366.

DAVET P., ARTICUES M. et MARTIN C., 1981 — Production en conditions non aseptiques d'inoculum de *Trichoderma harzianum* Rifai pour des essais de lutte. *Agronomie* 9 : 933-935.

DENNIS C. and WEBSTER J., 1971 — Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma.* (I) *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 57 : 25-39; (II) *Ibidem* 57 : 41-48; (III) - *Ibidem* 57 : 363-369.

FREDERICK P. and LEVINE M., 1947 — Antibiotic interactions ships among the enteric group of bacteria. *J. Bacteriol.* 54 : 785-792.

ISAAC I., 1954 — Studies in the antagonism between *Blastanyces luteus* and species of *Verticillium. Ann. Appl. Biol.* 41 : 305-310.

NEWTON B.A., 1965 — Mechanisms of antibiotic action. *Annual Rev. Microbiol.* 19 : 209-240.

TRONSMO A. and DENNIS C., 1978 — Effect of temperature on antagonistic properties of *Trichoderma* species. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 71 : 469-474.

TU J.C., 1979 — *Gliocladium virens*, a destructive mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum. Phytopathology* 70 : 670-674.

VIGOUROUX A. et CASTELAIN C., 1966 — Influence des façons culturales sur les effets de la Verticillose chez l'Abricotier. *Compt. Rend. Séances Acad. Agric. France* 52 : 1292-1297.

VIGOUROUX A. et MOLOT P.M., 1975 — Sensibilité à *Verticillium dahliae* et richesse en glucides de sept variétés d'Aubergine. *Ann. Phytopathol.* 7 : 123-132.

WEBSTER J. and LOMAS N., 1964 — Does *Trichoderma viride* produce gliotoxin and viridin ? *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 47 : 535-540.

WILSON K.S. and PORTER C.L., 1957 — The pathogenicity of *Verticillium albo-atrum* as affected by Muck soil antagonists. *Appl. Microbiol.* 6 : 155-159.

Source : MNHN, Paris